

Beschreibung  
Polyzyklische Makrolactone

Die Erfindung betrifft neue Substanzen, Verfahren zu deren Herstellung,  
5 Verwendung dieser Substanzen und pharmazeutische Zusammenset-  
zungen.

Infektionskrankheiten stellen nach wie vor weltweit ein sehr großes me-  
dizinisches Problem dar. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die  
10 zunehmend auftretenden Resistenzen von Erregern, insbesondere bei  
bakteriellen Erregern, wodurch diese Erreger auf die derzeit verfügbaren  
Medikamente nicht mehr reagieren. Zunehmend treten auch Bakterien  
auf, die gegen eine ganze Bandbreite von Wirkstoffen resistent sind,  
man spricht hier von multiresistenten Erregern. Viele der pathogenen  
15 multiresistenten Gram-positiven Bakterien, wie z. B. die multiresistenten  
und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) sind  
derzeit nur noch mit Glycopeptid-Antibiotika vom Vancomycin/Teico-  
planin-Typ therapierbar. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis vermehrt mul-  
tiresistente, einschließlich Vancomycin-resistente *Staphylococcus au-*  
20 *reus*-Stämme im Klinikbereich auftreten werden. Derart super-multiresis-  
tente Stämme wurden bereits vereinzelt diagnostiziert und bedeuten  
für den infizierten Patienten den Tod, da sie nicht therapierbar sind.

Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, neue Substanzen bereitzu-  
25 stellen, die als Wirkstoffe zur Bekämpfung von Erregern, insbesondere  
von bakteriellen Erregern, geeignet sind und so als neue Antibiotika ein-  
gesetzt werden können. Solche neuen Substanzen sollen als Leitstruk-  
turen dienen können, um daraus weitere wirksame Substanzen entwi-  
ckeln zu können.

30

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Substanz, wie sie in den Ansprü-  
chen 1, 5, 9, 10 und 11 beschrieben ist. Die Ansprüche 12 und 13 be-

fassen sich mit entsprechenden pharmazeutischen Zusammensetzungen. Die Ansprüche 14 bis 17 sowie der Anspruch 21 betreffen entsprechende Verwendungen der erfindungsgemäßen Substanzen bzw. ein Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen. Die Ansprüche 22  
5 und 24 richten sich auf einen Mikroorganismus, die Ansprüche 25 und 26 beschreiben geeignete Verfahren zur Herstellung der Substanzen. In den verschiedenen abhängigen Ansprüchen werden bevorzugte Ausführungsformen dieser Gegenstände beschrieben. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung  
10 gemacht.

Die erfindungsgemäße Substanz ist dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um ein polyzyklisches Makrolacton handelt, welches von einem Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosispora* herstellbar ist. Diese  
15 Substanz wird vorteilhafterweise von dem Bakterium sekretiert, d. h., daß sie bei einer Kultivierung des Bakteriums in den Kulturüberstand abgegeben wird. Besonders bevorzugt ist es, wenn diese Substanz pharmakologische Wirkung und insbesondere antibiotische Wirkung entwickelt. In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungs-  
20 gemäße Substanz diese antibiotische Wirkung vor allem gegenüber Gram-positiven Bakterien auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeigt die erfindungsgemäße Substanz cytotoxische Wirkung.

Die Erfinder konnten bevorzugte Ausführungsformen dieser erfindungsgemäßen Substanz durch die Isolierung und Charakterisierung eines neuen Bakterienstammes aus der Gattung *Verrucosispora* gewinnen. Dieser Stamm, der im folgenden als AB 18-032 bezeichnet wird, wurde aus einem Meeressediment isoliert, das aus 1000 m Tiefe in der Sagami-Bay in der japanischen See gesammelt wurde. Der Stamm wurde  
30 bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der DSM Nr. 15899 hinterlegt. Besonders bevor-

zugt ist es daher, daß die erfindungsgemäßen Substanzen von dem Bakterienstamm AB 18-032 herstellbar sind.

Der Bakterienstamm AB 18-032 hat die folgenden beschrieben morphologischen Charakteristika. Der Stamm wächst als Oberflächenkultur auf standardmäßigen Komplexagarmedien, wie z. B. ISP-2 Komplexmedium (0,4 % Hefeextrakt, 1 % Malzextrakt, 0,4 % Glukose, 1,5 % Agar) als orange-rote Kolonien, die sich nach ca. zweiwöchiger Inkubation bei 27 °C aufgrund der Sporulation schwarz verfärbten. Fig. 1 zeigt eine raster-elektronenmikroskopische Aufnahme des sporulierten Substratmyzels. Die chemotaxonomischen Eigenschaften des Stammes AB 18-032 sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Chemotaxonomische Charakterisierung des Stammes AB 18-  
15 032

Peptidoglycan	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure, der Acyltyp der Mura-minsäure ist Glycolyl-(A1γ')
Gesamtzellzucker	Xylose Mannose
Isoprenoidchinone	MK9 (H <sub>4</sub> ) als vorwiegendes Menachinon
Polare Lipide	Type II (Anwesenheit von Diphosphatidylethanolamin)

Für eine präzise phylogenetische Zuordnung wurde die komplette Nuk-  
20 leinsäuresequenz des Gens für die 16S ribosomale RNA durch direkte Sequenzierung der PCR-amplifizierten 16S rDNA bestimmt [Chun, J. & M. Goodfellow (1995), Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 240-245; Kim, S. B., C. Falkoner, S. T. Williams & M. Goodfellow (1998), J. Syst. Bacteriol. 48: 59-88]. Danach erfolgte der Vergleich der Sequenzdaten mit den be-  
25 kannten Sequenzen von Vertretern der Unterordnung *Micromonospori-*

*neae*. Die höchste Übereinstimmung der Sequenz von AB 18-032 wurde zu *Verrucosispora gifhornensis* mit 99,65 % gefunden. In Fig. 2 ist die Sequenz des Gens für die 16S rRNA von AB 18-032 dargestellt (SEQ ID No. 1). Aus dem Vergleich der Sequenzdaten für den Stamm AB 18-032 mit den bekannten Sequenzen der 16S rRNA von Vertretern der Unterordnung *Micromonosporineae* ergab sich die Position des Stammes dieser Erfindung auf dem phylogenetischen Stammbaum der *Micromonosporineae*, welcher in Fig. 3 dargestellt ist. Aufgrund der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA sowie der oben beschriebenen morphologischen und chemotaxonomischen Eigenschaften konnte der Stamm AB 18-032 zu der seltenen Actinomyceten-Gattung *Verrucosispora* zugeordnet werden. Dieser Stamm ist der erste marine Vertreter dieser Gattung und ist die zweite bislang in der Literatur beschriebene Art dieser Gattung.

15

Zur weiteren Charakterisierung des neuen Stammes AB 18-032 wurden seine phänotypischen Eigenschaften im Vergleich mit dem bekannten Stamm *Verrucosispora gifhornensis* [DSM 44337; Rheims, H., P. Schumann, M. Rohde & E. Stackebrandt (1998), Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 20 1119-1127] untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

25 Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften des Stammes AB 18-032 und

seines nächsten phylogenetischen Verwandten *Verrucosispora gifhornensis* DSM 44337

	<i>Verrucosispora gifhornensis</i> <sup>1</sup> DSM 44337	Stamm AB 18-032
<b>Kohlenstoffverwertung:</b>		
D(+)Xylose	++	-
D(-)Ribose	-	-

D-Fructose	-	-
D(+)-Glucose	++	+
D(+)-Galactose	+	-
D-Mannose	±	++
Maltose	+	++
Saccharose	+	++
D(+)- $\alpha$ -Trehalose	+	++
L(+)-Arabinose	++	++
L(-)-Rhamnose	-	-
L(-)-Sorbose	-	-
$\alpha$ -Lactose	-	+
$\alpha$ -Melibiose	-	+
D(+)-Melezitose	-	+
D(+)-Raffinose	-	+
Glycerin	-	+
Dulcitol	-	+
meso-Inosit	-	+
D-Sorbit	-	+
D-Mannit	-	+
Salicin	+	+

**Stickstoffverwertung:**

DL-Serin	+	++
L-Asparaginsäure	+	+
L-Glutaminsäure	+	++
L-Histidin	+	+
L-Arginin	+	++
L-Alanin	±	++
L-Valin	±	++
L-Methionin	-	++
L-Phenylalanin	+	++
L-Tryptophan	-	++

Casein	p	p
Cellulose-Abbau	n	n
Gelatine-Verflüssigung	p	nb
Bildung von Nitrat aus Nitrit	n	n
Stärkehydrolyse	p	p

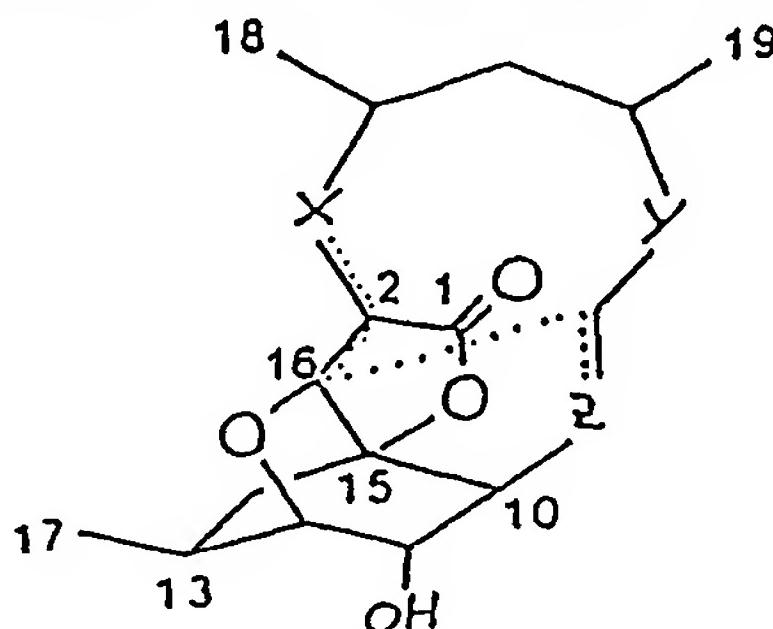
<sup>†</sup> Daten von Rheims et al. (1998)

+ +, gute Verwertung; +, normale Verwertung; ±, schlechte Verwertung;  
-, keine Verwertung; p, positiv; n, negativ; nb, nicht bestimmt

5

Dieser erstmals von den Erfindern isolierte und charakterisierte Vertreter der Gattung *Verrucosispora* produziert verschiedene Substanzen, die vorteilhafterweise pharmakologische Wirkung entfalten. Diese Substanzen werden im folgenden unter der Bezeichnung Abyssomicine zusammengefaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Substanzen durch die allgemeine Formel I



15

gekennzeichnet. Hierbei bezeichnet

20 X: C=O oder  
C-OH

25 Y: oder  
C=O

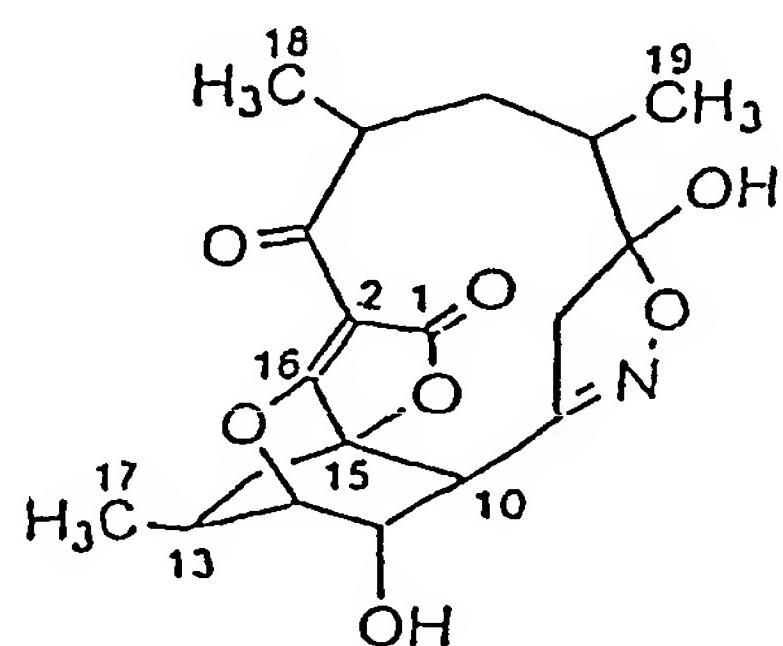
Z: C=N- oder  
CH oder  
CH<sub>2</sub>

- 5 Die punktierten Linien deuten Bindungen an, die vorhanden sein kön-  
nen. Die Ziffern bezeichnen die Numerierung der Kohlenstoffatome im  
Gerüst, die für die Zuordnung der <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C chemischen Verschiebun-  
gen der NMR-Analytik verwendet wurde. Die Formel I steht repräsentativ  
für alle denkbaren relativen Konfigurationen und umfaßt alle möglichen  
10 Stereoisomere.

Diese allgemeine Formel umfaßt verschiedene Substanzen, also poly-  
zyklische Makrolactone, die mit besonderen Vorteil als Wirkstoff gegen  
Mikroorganismen, insbesondere gegen Bakterien und/oder Protozoen,  
15 eingesetzt werden können. Die Struktur dieser Substanzen, also der A-  
byssomicine, stellt eine neue Leitstruktur dar, anhand welcher die Ent-  
wicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen vorgenommen wer-  
den kann.

- 20 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Substanzen  
ist durch die folgende Formel II

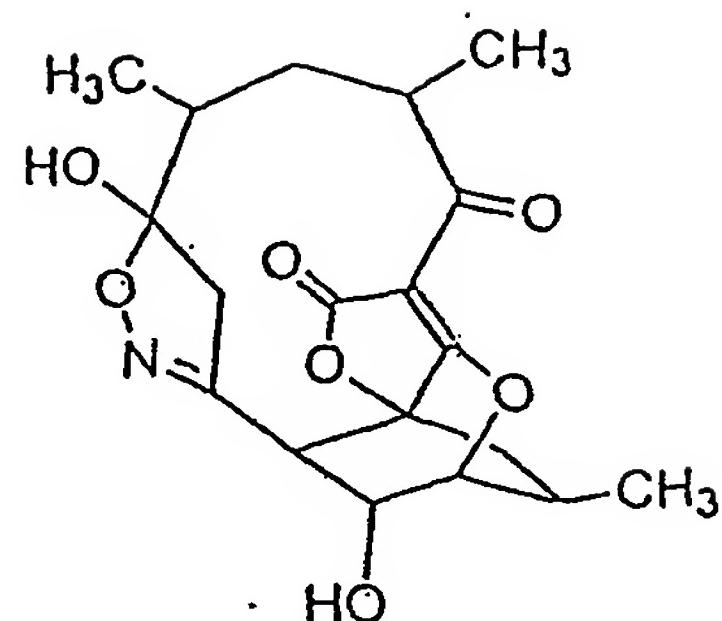
25 (II)



- 30 darstellbar. Diese Formel sowie auch alle anderen hier aufgeführten  
Formeln stehen stellvertretend für alle möglichen relativen Konfiguratio-  
nen, beispielsweise auch für die spiegelbildliche Formel IIa.

(IIa)

5

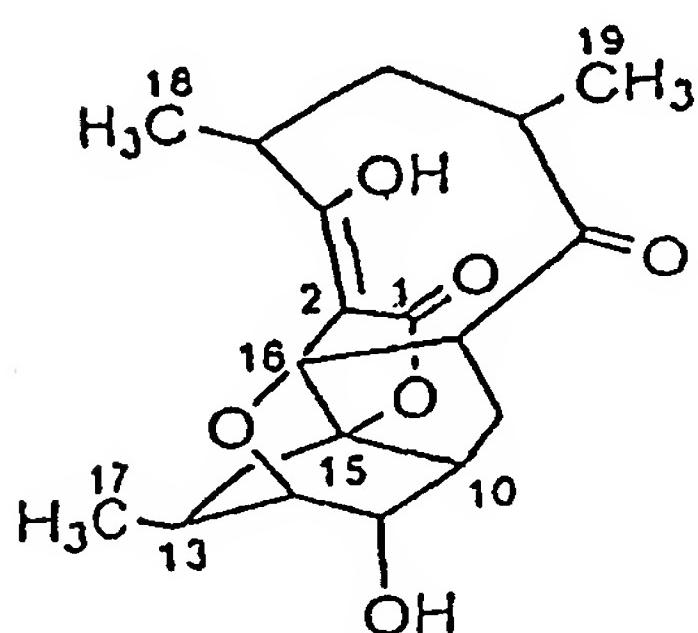


Eine weitere bevorzugte Ausführungsform lässt sich mit der Formel IV

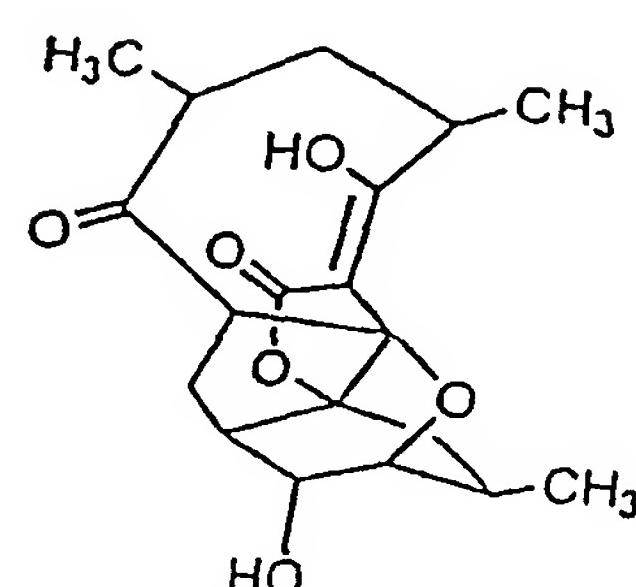
10

(IV)

15



bzw. (IVa)



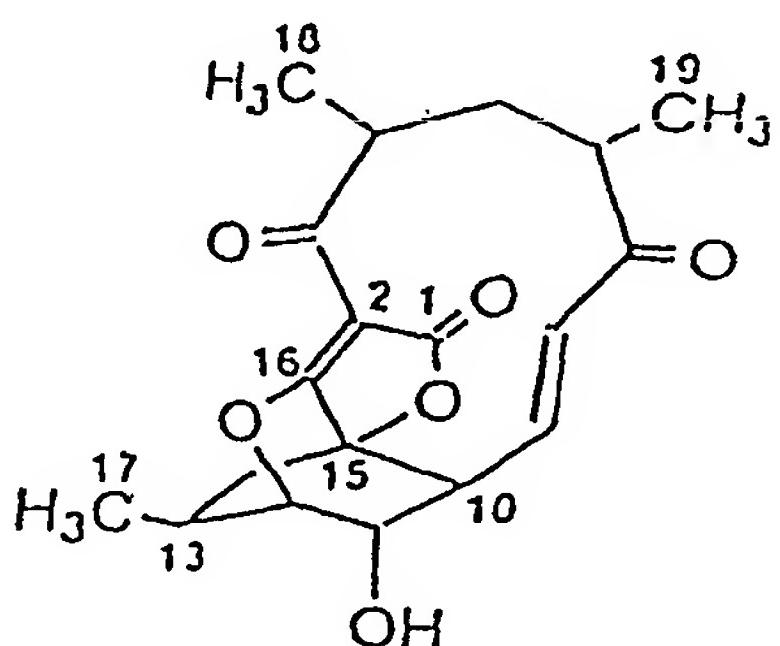
20 beschreiben, die ebenfalls alle möglichen Konfigurationen umfaßt.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Substanzen ist durch die Formel III

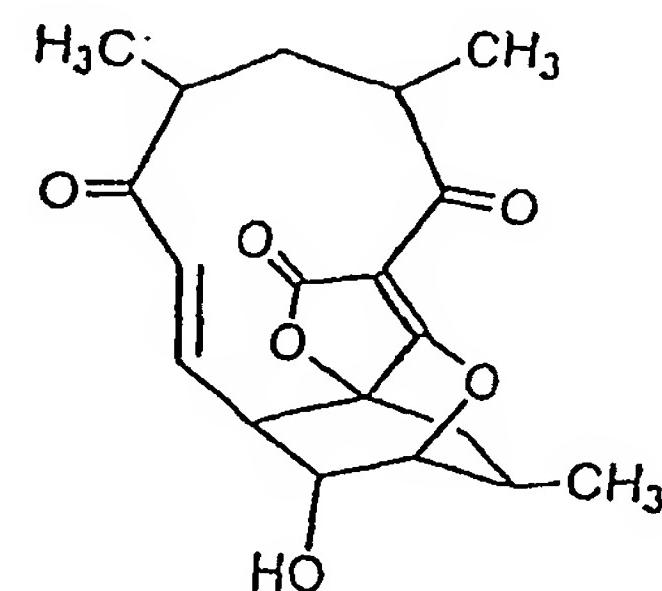
25

(III)

30



bzw. (IIIa)



mit jeweils allen möglichen relativen Konfigurationen gekennzeichnet. Insbesondere diese Ausführungsform ist durch besonders vorteilhafte antibiotische Eigenschaften gekennzeichnet, die sich insbesondere gegenüber Gram-positiven Bakterien auswirken. Die Substanz gemäß 5 Formel II wird im folgenden als Abyssomicin B, die Substanz gemäß Formel III als Abyssomicin C und die Substanz gemäß Formel IV als Abyssomicin D bezeichnet.

Die Erfindung umfaßt weiterhin Substanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Biosynthese der para-Aminobenzoësäure (pABA) 10 hemmen. Insbesondere hemmen diese erfindungsgemäßigen Substanzen die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure. Zur Veranschaulichung ist der Biosyntheseweg der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure auf der linken Seite der Fig. 4 dargestellt. Die para- 15 Aminobenzoësäure ist ein essentieller Baustein der Folsäurebiosynthese, die auf der rechten Seite der Fig. 4 dargestellt ist. Die erfindungsgemäßigen Substanzen hemmen also letztendlich die Folsäuresynthese. Hierbei handelt es sich um ein lebensnotwendiges Vitamin von Mikroorganismen, insbesondere von Prokaryonten und Protozoen, so daß durch 20 die erfindungsgemäßigen Substanzen deren Stoffwechsel derart beeinträchtigt wird, daß die entsprechenden Mikroorganismen mit den erfindungsgemäßigen Substanzen bekämpft werden können. Der besondere Vorteil dieses Angriffspunkts der erfindungsgemäßigen Substanzen ist, daß Säugetiere und insbesondere der Mensch diesen Biosyntheseweg 25 der Folsäure nicht besitzen, so daß vor allem Säugetier-Zellen von den erfindungsgemäßigen Substanzen nicht negativ beeinflußt werden. Folglich können die erfindungsgemäßigen Substanzen beispielsweise bei der Behandlung von Krankheiten, insbesondere von Infektionskrankheiten, im Menschen oder im Tier eingesetzt werden, ohne weitergehende Nebenwirkungen zu entfalten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Substanzen weisen diese Substanzen Merkmale gemäß 30 der obigen Beschreibung auf.

Weiterhin umfaßt die Erfindung polyzyklische Makrolactone als Substanzen, die als Teilstrukturen mindestens ein Oxabicyclo-System und mindestens ein Michael-System als Doppelbindungssystem aufweisen.

- 5 Bei dem Michael-System handelt es sich vorzugsweise um eine *trans*-Doppelbindung, die sich in Konjugation mit einem Keton befindet. Besonders bevorzugt ist es, wenn sich dieses Michael-System beispielsweise an den Positionen C7 bis C9 eines Ringsystems gemäß der allgemeinen Formel I befindet. Versuche der Erfinder haben gezeigt, daß  
10 ein solches Michael-System vorteilhafterweise direkt an dem Wirkungsmechanismus der erfindungsgemäßen Substanzen beteiligt sein kann, indem es beispielsweise mit nukleophilen Aminosäureseitenketten vorteilhafterweise irreversibel wechselwirkt. Das erfindungsgemäß in den polyzyklischen Makrolactonen enthaltende Oxabicyclo-System weist  
15 Ähnlichkeiten mit der Lösungskonformation von Chorismat auf. Die entsprechenden Konformationen von Chorismat sind zur Erläuterung in Fig. 7 A dargestellt. Die erfindungsgemäßen Substanzen können daher in gewisser Weise das Substrat Chorismat nachahmen, so daß sich hierdurch die besondere Wirkung der erfindungsgemäßen Substanzen er-  
20 klären läßt. Dieses Oxabicyclo-System kann beispielsweise so ausgestaltet sein, wie es sich aus den Formeln I bis IV ergibt. Besonders bevorzugt ist es, wenn sich ein solches Bicyclo-System in der Nähe des beschriebenen Michael-Systems befindet. Eine bevorzugte Ausführungsform einer solchen Substanz, die ein Michael-System und ein Oxa-  
25 bicyclo-System aufweist, läßt sich beispielsweise durch die Formel III beschreiben.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Position C12 in den beispielhaften Substanzen gemäß den Formeln I bis IV eine (R)-Konfiguration zeigt.

- 30 Zur Erläuterung wird auf die Fig. 7 B verwiesen, welche Beispiele für die erfindungsgemäßen Substanzen in entsprechender Konfiguration zeigt,

wobei die hier gezeigten Formeln von links nach rechts den Formeln II, III und IV entsprechen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Substanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich dabei um Derivate der oben beschriebenen polzyklischen Makrolactone handelt. Bei diesen Substanzen kann es sich um natürlich vorkommende Substanzen handeln. Andererseits werden hiervon auch Substanzen umfaßt, die zumindest zum Teil synthetisch oder auch mit anderen Mitteln hergestellt sind und beispielsweise von natürlich vorkommenden Substanzen abgeleitet sein können. So können beispielsweise die oben beschriebenen Substanzen als Leitstrukturen verwendet werden, um entsprechend geeignete Substanzen, die möglicherweise gegenüber den Ausgangssubstanzen weitere Vorteile aufweisen, zu entwerfen und herzustellen. Hierbei kann es sich vorteilhafterweise um antibiotisch wirksame Substanzen handeln, die ähnliche oder verbesserte antibiotische Wirksamkeit wie die Ausgangssubstanz haben, die aber beispielsweise bezüglich Nebenwirkungen in einem Organismus oder Bioverfügbarkeit in einem Organismus bessere Eigenschaften aufweisen als die Ausgangssubstanzen. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Substanzen wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

In einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, welche mindestens eine Substanz gemäß der obigen Beschreibung und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweisen. Insbesondere umfaßt die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, welche neben mindestens einem pharmazeutisch akzeptablen Träger mindestens eine Substanz aufweisen, welche die Biosynthese der para-Aminobenzoësäure hemmt, und insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure hemmt. Mit diesen pharmazeutischen Zusammensetzungen können vorteilhafterwei-

se Mikroorganismen und insbesondere Bakterien und/oder Protozoen bekämpft werden.

Besonders vorteilhaft sind diese pharmazeutischen Zusammensetzungen für die Behandlung von Infektionskrankheiten verwendbar, welche durch Bakterien verursacht sind oder zumindest durch Bakterien beeinflußt werden. Ganz besonders bevorzugt ist es, wenn diese pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Bekämpfung von Gram-positiven Bakterien eingesetzt werden. Weiterhin eignen sich die pharmazeutischen Zusammensetzungen auch zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch andere Mikroorganismen, wie beispielsweise Protozoen, verursacht oder zumindest beeinflußt werden. Beispiele für infektiöse Protozoen, die mit den erfindungsgemäß Substanzen bekämpft werden können, sind Plasmodien, Leishmanien und Trypanosomen, welche für tropische Infektionskrankheiten (Malaria, Leishmaniose, Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas-Krankheit) verantwortlich sind. Die besonders vorteilhafte Wirkung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bzw. der entsprechenden Substanzen beruht vor allem darauf, daß durch diese Substanzen die Biosynthese der Folsäure letztendlich gehemmt wird. Dieser Stoffwechselweg ist nur in den zu bekämpfenden Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und/oder Protozoen, und nicht in Tieren oder Menschen vorhanden, welche mit diesen Zusammensetzungen behandelt werden können. Besonders vorteilhaft können hiermit klinisch-pathogene Mikroorganismen bekämpft werden, insbesondere pathogene multiresistente Bakterien, die auf herkömmliche Antibiotika nicht mehr ansprechen. Mit sehr großem Vorteil sind die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Infektionskrankheiten geeignet, die durch Gram-positive Bakterien zumindest mitbeeinflußt werden. Beispielsweise sind mit den erfindungsgemäß pharmazeutischen Zusammensetzungen multiresistente und insbesondere Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) bekämpfbar. Es können beispielsweise auch Infektionskrankheiten behan-

delt werden, bei welchen *Staphylococcus aureus*-Stämme beteiligt sind, die neben verschiedenen anderen Resistzenzen auch gegen Vancomycin resistent sind. Resistzenzen gegenüber Vancomycin sind bereits verschiedentlich diagnostiziert worden. Eine Behandlung mit den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen kann insbesondere in einem solchen Fall den Patienten vor dem Tod bewahren, da es ansonsten keine Therapiemöglichkeit für derartige super-multiresistente Stämme gibt. Selbstverständlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen auch für die Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen eingesetzt werden, die keine oder nur wenige Resistzenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika entwickelt haben.

Die Erfindung umfaßt auch die Verwendung der oben beschriebenen Substanzen zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind. Die Erfindung umfaßt außerdem die Verwendung von Substanzen zur Behandlung der genannten Infektionskrankheiten, wobei die Substanzen die Synthese der para-Aminobenzoësäure hemmen und insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorismsäure hemmen. Die Verwendung entsprechender Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die von Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind, wird ebenfalls umfaßt. Ferner umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Infektionskrankheiten, welche durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind, wobei mindestens eine Substanz im Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der obigen Beschreibung verabreicht wird. Bezüglich weiterer Merkmale dieser verschiedenen Verwendungen und Verfahren wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien und/oder Protozoen, wobei mindestens eine der erfindungsgemäß Substanzen, die oben beschrieben sind, verwendet wird. Bei einer solchen Bekämpfung von Mikroorganismen kann es sich beispielsweise um ein Desinfektionsverfahren handeln. Insbesondere im Krankenhaus oder in anderen medizinischen Einrichtungen ist es unbedingt erforderlich, daß Oberflächen verschiedenster Art, wie beispielsweise Oberflächen von Operationsbesteck oder von Einrichtungsgegenständen, entkeimt werden, um eine Infektion mit krankheitserregenden Mikroorganismen zu verhindern. Die erfindungsgemäß Substanzen können in diesem Zusammenhang sehr vorteilhaft eingesetzt werden, dies geschieht besonders bevorzugt in Kombination mit anderen desinfizierenden Mitteln.

15 Die Erfindung umfaßt ferner einen Mikroorganismus, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er mindestens eine Substanz produzieren kann, wie sie oben beschrieben ist. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium, wobei dieses Bakterium vorzugsweise ein Vertreter der Gattung *Verrucosispora* ist. Besonders bevorzugt ist es, daß es sich hierbei um den Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) handelt. Bei dem Bakterienstamm AB 18-032 handelt es sich um den Stamm, aus welchem die Erfinder die beispielhaft aufgeführten Substanzen isolieren konnten. Mutanten dieser Mikroorganismen und insbesondere des Stammes AB 18-032 werden ebenfalls von der Erfindung umfaßt. Die Erfindung umfaßt auch andere Mikroorganismen, die entsprechende Substanzen produzieren. Besonders bevorzugt sind hierbei Mikroorganismen, die beispielsweise größere Mengen der erfindungsgemäß Substanzen produzieren können.

20 Mit diesen Mikroorganismen können mit besonderem Vorteil die Mengen der erfindungsgemäß Substanzen hergestellt werden, die für therapeutische Einsätze erforderlich sind.

25

Schließlich umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung mindestens einer erfindungsgemäßen Substanz, wobei hier zunächst ein Mikroorganismus kultiviert wird, der in der Lage ist, mindestens eine der beschriebenen Substanzen zu produzieren. Bevorzugterweise wird die Substanz von dem Mikroorganismus sekretiert, so daß in einem nächsten Verfahrensschritt ein Filtrat des Kulturüberstands hergestellt wird, in welchem sich die gewünschte Substanz befindet. Dieses Kulturfiltrat oder auch der Kulturüberstand kann direkt verwendet werden, um die erfindungsgemäßen Substanzen entsprechend einzusetzen. Andererseits können die Substanzen auch aus dem Kulturfiltrat oder dem Kulturüberstand isoliert und vorzugsweise mehr oder weniger gereinigt werden, um so die Substanz in gereinigter Form zur Verfügung zu haben. Dies ist vor allem für medizinische Anwendungen vorteilhaft, da für den pharmazeutischen Einsatz möglichst nur gereinigte Substanzen zu verwenden sind, um unerwünschte Wirkungen anderer Stoffe zu vermeiden. Weiterhin kann es bevorzugt sein, daß die Substanz nicht sekretiert wird, sondern innerhalb des Mikroorganismus verbleibt. In diesem Fall wird die Substanz durch geeignete, dem Fachmann bekannte Methoden aus den kultivierten Mikroorganismen isoliert. Als Mikroorganismus wird vorzüglicherweise der Stamm AB 18-032 verwendet. Es kann jedoch auch sehr vorteilhaft sein, einen Mikroorganismus einzusetzen, der beispielsweise hinsichtlich der Menge der zu produzierenden Substanz optimiert ist. Eine entsprechende Optimierung kann beispielsweise durch entsprechende Selektion erfolgen. Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von einem Medium, welches mindestens eine Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält. Die anschließende Gewinnung der Substanzen erfolgt bevorzugt aus dem Kulturfiltrat, kann jedoch auch direkt aus dem Kulturüberstand erfolgen. Die Substanzen können aus dem Kulturfiltrat oder dem Überstand beispielsweise durch Lösungsmittelextraktion (z. B. Ethylacetat) isoliert werden. Eine andere Möglichkeit ist beispielsweise eine Säu-

- lenchromatographie mit einem Polystyrolharz (z. B. Amberlite XAD-16). Eine weitere Isolierung oder Reinigung kann durch Auftrennung der verschiedenen Substanzen durch beispielsweise Absorptions- und/oder Ausschlußchromatographie erfolgen. Durch eine Kristallisation können 5 die Substanzen in reiner Form gewonnen werden. Gegebenenfalls können die gereinigten Substanzen mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden. Einzelheiten zu diesem Herstellungsverfahren erschließen sich dem Fachmann ohne weiteres.
- 10 Einzelheiten zu den beschriebenen Merkmalen sowie weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung von Beispielen in Verbindung mit den Figuren und den Unteransprüchen. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder in Kombination miteinander verwirklicht sein.
- 15
- In den Figuren zeigen:
- Fig. 1 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Stammes AB 18-  
20 032,
- Fig. 2 Sequenz des Gens der 16S rRNA des Stammes AB 18-032  
(SEQ ID No. 1),
- 25 Fig. 3 Position des Stammes AB 18-032 im phylogenetischen Stammbaum der Unterordnung *Mikromonosporineae* (Stammbaum nach Saitou, N. & M. Nei (1987), Mol. Biol. Evol. 4: 406-425),
- Fig. 4 Biosyntheseweg der para-Aminobenzoësäure (links) und der  
30 Folsäure (rechts),

Fig. 5 UV-Spektren der Abyssomicine gemäß den Formeln II, III und IV,

Fig. 6 minimale Hemmkonzentration der Substanz gemäß Formel III  
5 (Abyssomicin C) gegen die multiresistenten Stämme *Staphylococcus aureus* N135 und *Staphylococcus aureus* Mu50,

Fig. 7 (A) diaxiale Konformation von Chorismat in wässriger Lösung; (B)  
10 Konfigurations-Strukturformeln der Substanzen gemäß den Formeln II, III und IV.

### Beispiele

15 1. Screening nach Hemmstoffen der Biosynthese der Chorismsäure, der para-Aminobenzoesäure (pABA) und der aromatischen Aminosäuren

Hemmstoffe der Chorismsäurebiosynthese und der Biosynthesewege,  
20 die sich von der Chorismsäure ableiten, werden sich mit einem sogenannten Kreuztest ermittelt, der auf einem modifizierten Agardiffusionstest beruht. Als Testorganismus wird *Bacillus subtilis* verwendet, der in einem chemisch-definierten Agarmedium eingegossen wird. Der eine Filterpapierstreifen des Kreuztestansatzes wird mit einem Zellextrakt getränkt, der zweite Filterpapierstreifen mit folgender Variation: (a) Tyr +  
25 Phe + Trp + pABA, (b) Tyr + Phe, (c) Trp und (d) pABA. Nach dem Muster der Aufhebung der einzelnen Varianten kann entschieden werden, ob es sich um einen Hemmstoff der frühen Aromatenbiosynthese handelt (vor der Chorismsäure) oder um einen Hemmstoff, der nach der Chorismsäure eingreift, und ob es sich hierbei um einen Hemmstoff der Tyrosin (Tyr)/Phenylalanin (Phe)-Biosynthese, der Tryptophan (Trp)-Biosynthese oder der para-Aminobenzoesäure (pABA)-Biosynthese

handelt. Nur der Extrakt, dessen Hemmwirkung durch (a) und (d) antagonisiert wird, enthält einen Antagonisten der pABA, der die pABA-Biosynthese nach der Chorisminsäure hemmt. Mit diesem Test wurde der Stamm AB 18-032 gefunden, der die wirksamen Substanzen produziert.

5

### 2. Produktion der polyzyklischen Makrolactone durch den Bakterienstamm AB 18-032

10 Die polyzyklischen Makrolactone werden vom Stamm AB 18-032 während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 10-Liter-Blattrührfermenter wird mit 9,5 Liter Komplexmedium (1 % Glucose, 1 % Stärke, 1 % Glycerin, 0,25 % Corn Steep Powder, 0,5 % Pepton, 0,2 % Hefeextrakt, 0,1 % NaCl, 0,3 % CaCO<sub>3</sub>; pH 7,3) gefüllt. Der 15 Fermenter wird mit 5 Volumen-% einer 48-stündigen Schüttelkultur (500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich, 100 ml Komplexmedium, 120 Upm, 27 °C) angeimpft. Der Fermenter wird bei 27°C, einer Drehzahl von 200 Upm und einer Belüftung von 0,5 vvm 4-5 Tage inkubiert. Die polyzyklischen Makrolactone sind mit HPLC-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) und biologischer Testierung im Kulturüberstand 20 nachweisbar.

25

### 3. Isolierung der polyzyklischen Makrolactone

25

Die Fermenterbrühe wird unter Zusatz von 2 % Filterhilfsmittel (Hyphlo-Supercel) in Biomasse und Kulturfiltrat getrennt. Die Biomasse wird verworfen. Das Kulturfiltrat wird auf pH 4 eingestellt (HCl) und 2 x mit je ¼ Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer bis zum öligen Rückstand konzentriert. Der ölige Rückstand wird 2 x mit einem kleinen Volumen Petro-

30

leumbenzin extrahiert, um Fette zu entfernen. Der Petroleumbenzin-Extrakt wird verworfen.

Der ölige Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und an einer Sephadex LH-20-Säule (100 x 5 cm) in Methanol in die einzelnen Substanz-Rohfraktionen aufgetrennt. Die Isolierung von reinen polyzyklischen Makrolactonen erfolgt durch Niederdruck-Chromatographie an einer LiChroprep Diol-Säule (40 x 2,6 cm) und einem linearen Gradienten von Dichlormethan zu Dichlormethan/Methanol (90+10) in 3 Stunden bei einem Fluß von 2 ml/min, und einer nachfolgenden Ausschluß-Chromatographie an einer Fractogel TSK HW 40-Säule (90 x 2,5 cm) in Methanol bei einem Fluß von 0,5 ml/min.

#### 4. HPLC-DAD-Analytik der polyzyklischen Makrolactone

15 Chromatographische Ausstattung: HP 1090 Liquid Chromatograph mit integriertem Diodenarray-Detektionssystem und HP Kayak XM 600-ChemStation mit HPLC-Software A.08.03 (Agilent Technologies). Die Mehrkanaldetektion erfolgte bei 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 und  
20 500 nm, die UV-Vis-Spektren wurden bei 200-600 nm registriert.

Trennparameter: HPLC-Säule gefüllt mit Nucleosil-100 C-18 (125 x 4,6 mm, Vorsäule 20 x 4,6 mm, Korngröße 5 µm; Macherey & Nagel). Lineare Gradientenelution von 100 % wäßriger Phosphorsäure (0,1 % v/v) zu  
25 100 % Acetonitril in 15 min bei einem Fluß von 2 ml/min. Das Injektionsvolumen beträgt 10 µl. Die Retentionszeiten betragen für Abyssomicin B 6,7 min, Abyssomicin C 7,35 min, Abyssomicin D 9,0 min. Neben den Retentionszeiten werden die Abyssomycine anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert (Fig. 5).

## 5. Strukturaufklärung

LC-MS-Experimente: Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies) gekoppelt an Bruker Esquire 3000+-Massenspektrometer (Bruker-Daltonics).

ESI-FTICR-MS: Die Massenspektren wurden auf einem APEX II FTICR Massenspektrometer (4.7 T; Bruker-Daltonics) aufgenommen. Zur internen Kalibrierung wurden PEG 400 verwendet.

10

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Experimente (1D:  $^1\text{H}$ , 2D: COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) wurden auf einem AMX 600 NMR-Spektrometer (Bruker) mit 5 mm Trippelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten durchgeführt.

15 

## 6. Physiko-Chemische Eigenschaften

Die isolierten Substanzen zeigten folgende physiko-chemischen Eigenschaften:

20 

### Abyssomicin B:

farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_7$  [377]

ESI-FTICR-MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 400.13654 \text{ Da } ([\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{theor.}} = 400.13667 \Delta m = 0.34 \text{ ppm}; \text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{Na})$

$^1\text{H}$ -NMR- /  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten: siehe Tabelle 3

Tabelle 3:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin B ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 305 K); Kopplungskonstanten nicht bestimmt

No.	$^1\text{H} \delta$ [ppm]	$^{13}\text{C} \delta$ [ppm]
1	-	169.4
2	-	99.7
3	-	212.6
4	3.18	41.9
5	2.59 (a) 2.59 (b)	34.8
6	2.14	43.7
7	-	197.1
8	1.33 (a) 1.77 (b)	38.5
9	-	n.b.
10	2.59	45.8
11	4.24 5.82 (OH)	68.9
12	4.55	84.5
13	2.55	24.2
14	2.54 (a) 1.04 (b)	36.9
15	-	78.0
16	-	184.5
17	0.99	18.7
18	0.97	16.6
19	0.96	20.1

5 n.b. = nicht bestimmt

### Abyssomicin C

farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

10 Summenformel:  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$  [346]

ESI-FTICR-MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 369.13079$  Da ( $[\text{M}+\text{Na}]_{\text{ther.}}^+ = 369.13085$   $\Delta m = 0.20$  ppm;  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$ )

$^1\text{H}$ -NMR- /  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten: siehe Tabelle 4

Tabelle 4:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin C ( $[\text{D}_4]\text{MeOD}$ , 298 K)

No.	$^1\text{H} \delta$ [ppm]	Kopplungskonstanten [Hz]	$^{13}\text{C} \delta$ [ppm]
1	-	-	173.8
2	-	-	106.7
3	-	-	202.8
4	3.51	m $^3J_{4,18} = 6.7$ ; $^3J_{4,5a} = 11.2$ ; $^3J_{4,5b} = 2.7$	45.3
5	2.01 (a) 1.44 (b)	m $^2J_{5a,5b} = 14.1$ ; $^3J_{5a,4} = 11.2$ ; $^3J_{5a,6} = 10.1$ m $^2J_{5b,5a} = 14.1$ ; $^3J_{5b,4} = 2.7$ ; $^3J_{5b,6} = 1.6$	42.3
6	2.94	m $^3J_{6,5a} = 10.1$ ; $^3J_{4,5b} = 1.6$ ; $^3J_{6,19} = 7.2$	50.3
7	-	-	208.4
8	6.55	m $^3J_{8,9} = 13.5$	137.1
9	5.98	dd $^3J_{9,8} = 13.5$ ; $^3J_{9,10} = 9.5$	137.3
10	2.99	dd $^3J_{10,9} = 9.5$ ; $^3J_{10,11} = 6.1$	51.5
11	5.06 4.59 (OH)	dd $^3J_{11,10} = 6.1$ ; $^3J_{11,12} = 3.3$ -	76.0
12	4.57	d $^3J_{12,11} = 3.3$ ; $^3J_{12,13} = \text{n.b.}$	88.9
13	2.73	n.b.	28.1
14	1.26 (a) 2.69 (b)	dd $^2J_{14a,14b} = 12.4$ ; $^3J_{14a,13} = 23.9$ dd $^2J_{14b,14a} = 12.4$ ; $^3J_{14b,13} = 2.4$	39.6
15	-	-	81.1
16	-	-	189.8
17	1.17	d $^3J_{17,13} = 17.0$	21.5
18	1.09	d $^3J_{18,4} = 6.7$	19.3
19	1.11	d $^3J_{19,6} = 7.2$	23.0

n.b. = nicht bestimmt

5

#### Abyssomicin D:

farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

Summenformel  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$  [348]

- 10 ESI-FTICR-MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 371.14663$  Da ( $[\text{M}+\text{Na}]^+_{\text{theor.}} = 371.14650$  Δm = 0.32 ppm;  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{Na}$ )  
 $^1\text{H}$ -NMR- /  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten: siehe Tabelle 5

Tabelle 5:  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin D ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 305 K)

No.	$^1\text{H} \delta$ [ppm]	Kopplungskonstanten [Hz]	$^{13}\text{C} \delta$ [ppm]
1	-	-	172.9
2	-	-	98.0
3	-	-	178.9
	11.04 (OH)	-	-
4	2.42	m n.b.	39.5
5	1.59 (a) 2.70 (b)	dd $^2J_{5a,5b} = 15.0$ ; $^3J_{5a,4} = \text{n.b.}$ ; $^3J_{5a,6} = \text{n.b.}$ dd $^2J_{5b,5a} = 15.0$ ; $^3J_{5b,4} = \text{n.b.}$ ; $^3J_{5b,6} = \text{n.b.}$	32.5
6	2.14	m n.b.	47.3
7	-	-	210.3
8	3.57	t $^3J_{8,9a} = 8.03$ ; $^3J_{8,9b} = 9.8$	57.8
9	1.54 (a) 2.00 (b)	dd $^3J_{9a,9b} = 12.0$ ; $^3J_{9a,8} = 8.03$ ; $^3J_{9b,10} = \text{n.d.}$ m $^3J_{9b,9a} = 12.0$ ; $^3J_{9b,10} = 3.5$ ; $^3J_{9b,8} = 9.8$	26.1
10	2.26	d $^3J_{10,9b} = 3.5$ ; $^3J_{10,11} = \text{n.b.}$ ; $^3J_{10,9a} = \text{n.b.}$	47.5
11	4.09 5.53 (OH)	d $^3J_{11,12} = 4.0$ ; $^3J_{11,10} = \text{n.d.}$ -	72.1
12	3.54	d $^3J_{12,11} = 4.0$ ; $^3J_{12,13} = \text{n.b.}$	76.0
13	2.46	m n.b.	23.7
14	2.29 (a) 0.91 (b)	dd n.b. dd n.b.	31.8
15	-	-	86.9
16	-	-	84.5
17	0.93	d $^3J_{17,13} = 6.8$	18.0
18	1.27	d $^3J_{18,4} = 7.4$	18.7
19	1.01	d $^3J_{19,6} = 7.1$	18.3

n.b. = nicht bestimmt

5

### 7. Antibiotische Aktivität im Agardiffusionstest und Wirkspektrum

Abyssomicin C zeigt im Agardiffusionstest eine antibiotische Wirkung,  
 10 die sich vor allem gegen die getesteten Gram-positiven Bakterien richtet.  
 Die getesteten Gram-negativen Bakterien und Pilze waren gegenüber

den Abyssomicinen unempfindlich. Das antibiotische Wirkspektrum ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Antibiotische Aktivität von Abyssomicin C im Agardiffusions-  
5 onstest (10 µl Antibiotikumlösung pro Filterrondelle; Hemmzonendurch-  
messer in mm)

Testorganismus	Medium	Abyssomicin C (mg/ml)		
		1	0,3	0,1
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20166	KM	14	10	-
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30	KM	17	12	9
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30	MM	30	24	19
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	KM	16	12	10
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	MM	26	19	14
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 381	KM	-	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM 750	KM	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	KM	19	11	9
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	KM	27	18	15
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	MM	30	28	21
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	KM	11	9	-

KM, Komplexmedium; MM, chemisch-definiertes Medium

10

#### 8. Minimale Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MIC) von Abyssomicin C wurde in  
15 einem Verdünnungsreihentest ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7  
dargestellt. Die Testkeime sind in chemisch-definierten Medium erwar-  
tungsgemäß wesentlich empfindlicher gegenüber Abyssomicin C.

Tabelle 7: Minimale Hemmkonzentration (MIC; µg/ml) von Abyssomicin C im Verdünnungsreihentest (2 ml-Reagenzglasmaßstab, Schüttelmaschine 120 Upm)

Testorganismus	Medium	MIC
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	KM	10
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	MM	0,1
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	KM	10
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	KM	100

5

Die Ermittlung der MIC gegenüber klinisch pathogenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen wurden in einem Mikrotiterplattenassay durchgeführt. Es wurde die Wirksamkeit von Abyssomicin C gegenüber dem multiresistenten, einschließlich Methicillin-resistenten Stamm *S. aureus* N315 sowie gegenüber dem multiresistenten, einschließlich Vancomycin-resistenten Stamm *S. aureus* Mu50 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.

10  
15

-----

Patentansprüche

1. Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein polyzyklisches Makrolacton ist und von einem Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosispora* herstellbar ist.

5

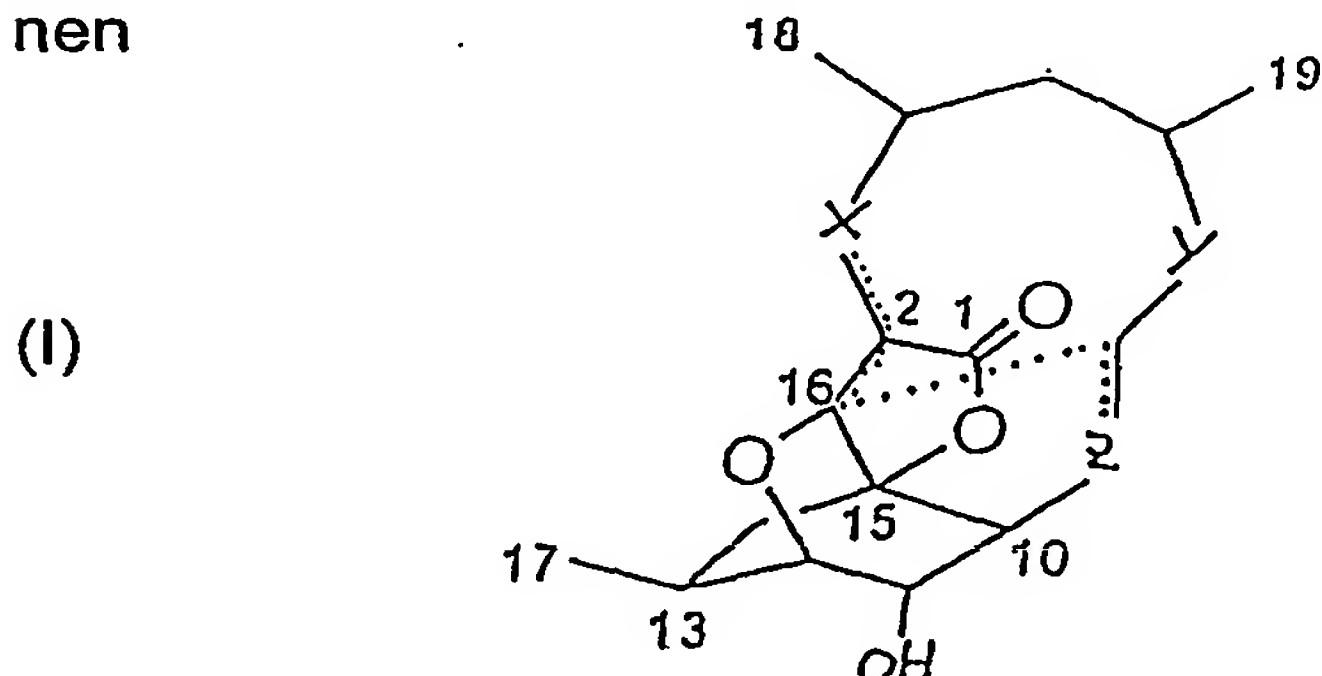
2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie pharmakologische Wirkung, insbesondere antibiotische Wirkung, aufweist.

10

3. Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie antibiotische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien aufweist.

15 4. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosispora* der Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) ist.

20 5. Substanz, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 4, durch die allgemeine Formel I mit allen möglichen relativen Konfigurationen

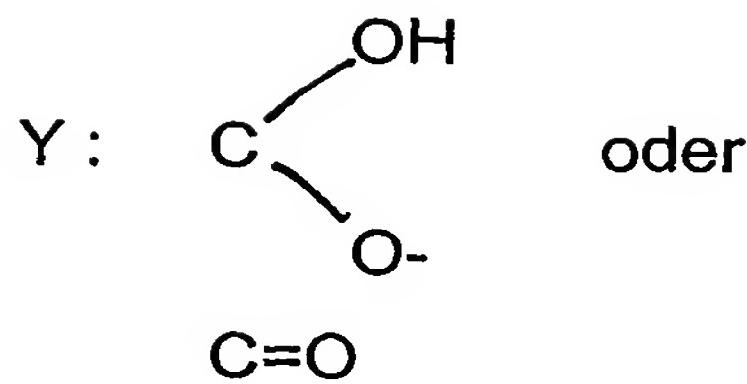


25 gekennzeichnet, wobei

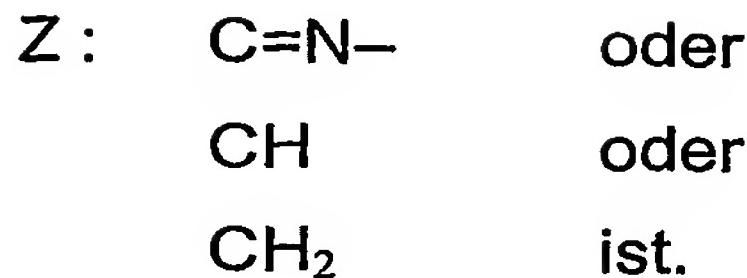
X : C=O oder

C-OH

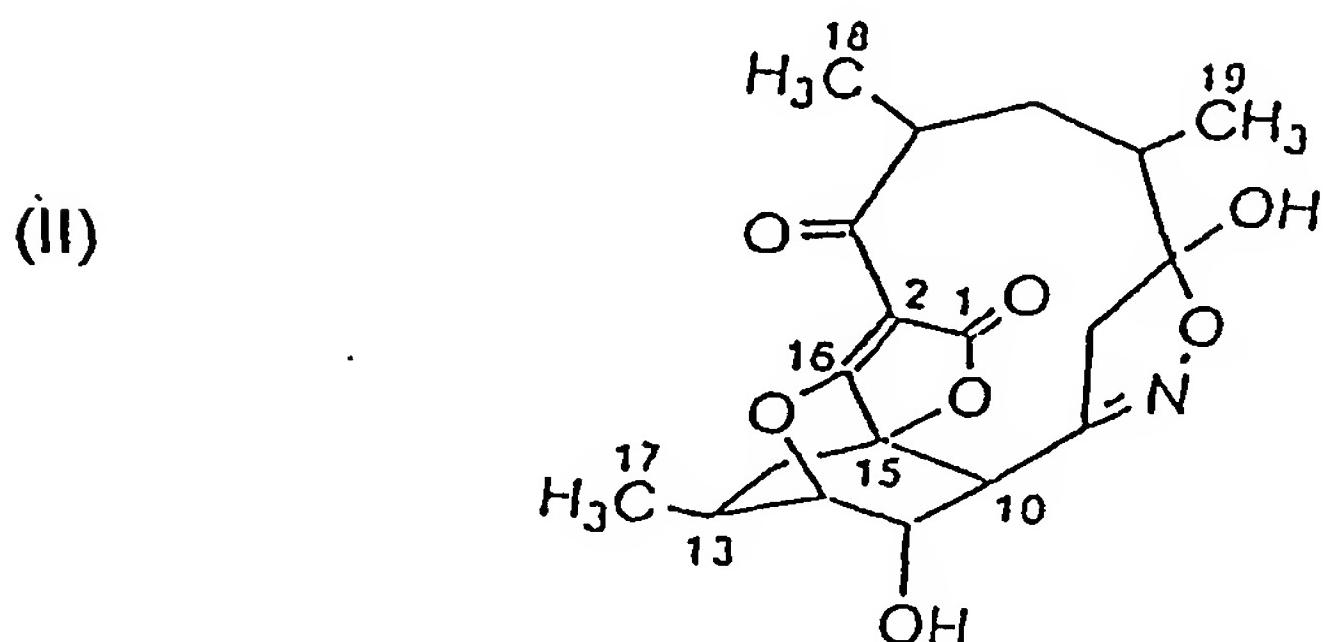
30



5



- 10 6. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel II mit allen möglichen relativen Konfigurationen



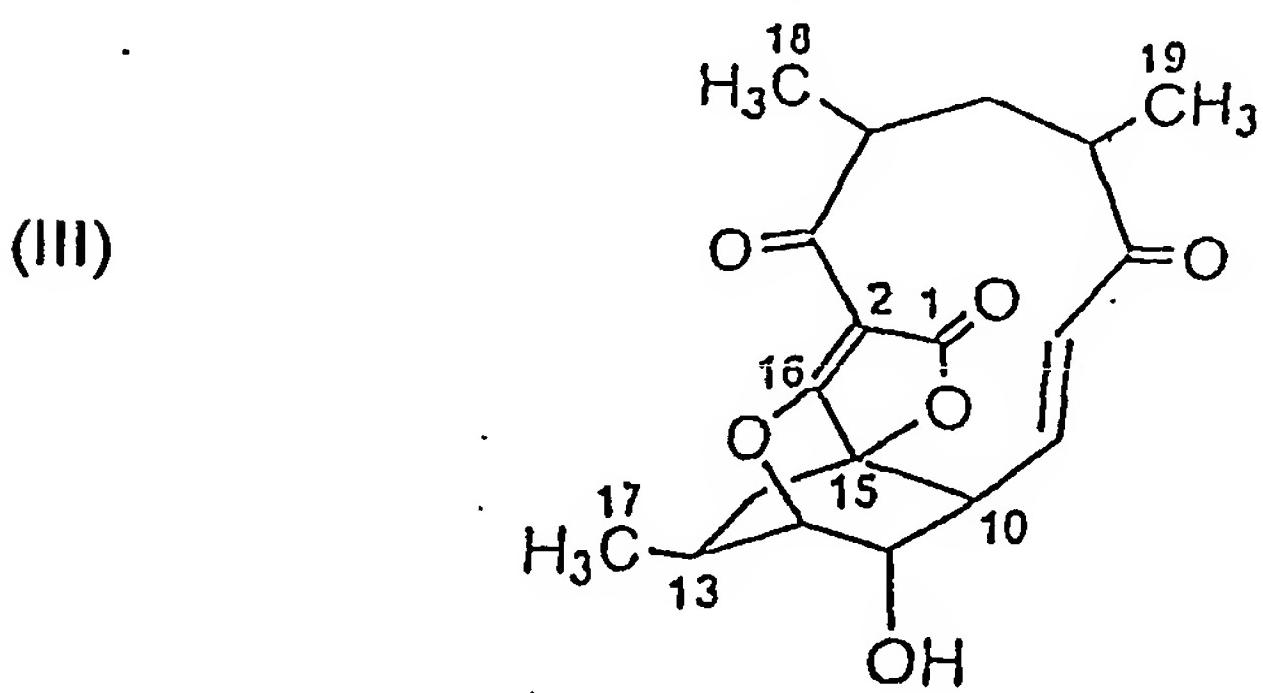
15

gekennzeichnet.

20

7. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel III mit allen möglichen relativen Konfigurationen

25

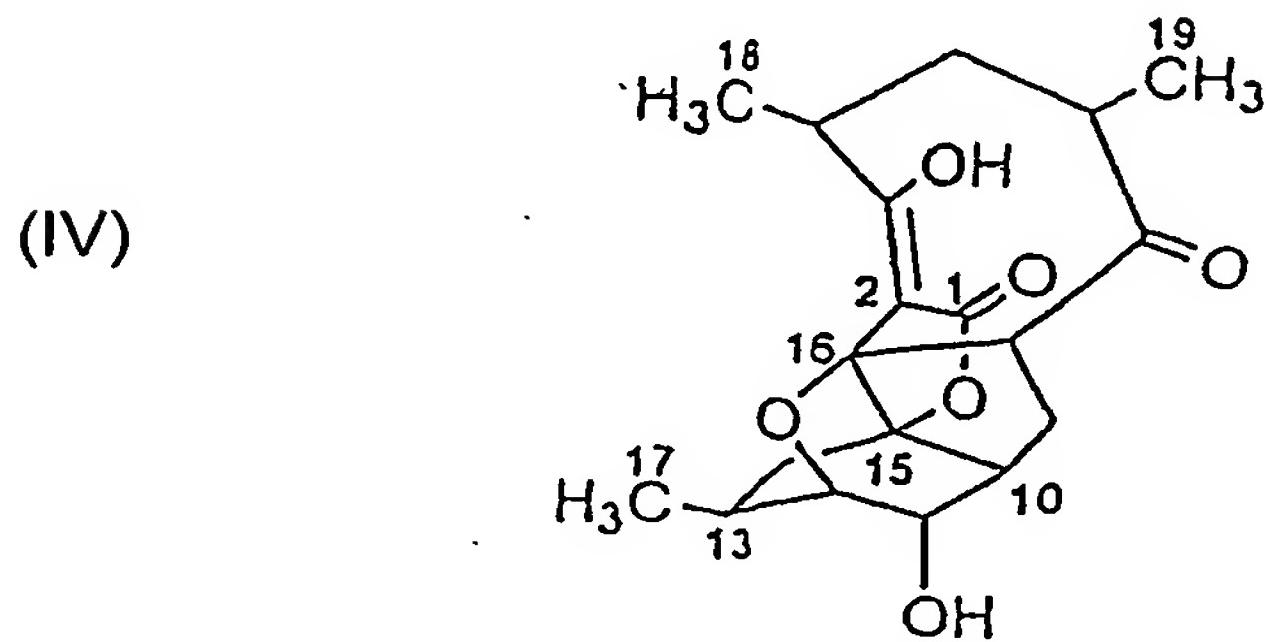


30

gekennzeichnet.

8. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel IV mit allen möglichen relativen Konfigurationen

5



10

15 gekennzeichnet.

9. Substanz, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Synthese der para-Aminobenzoësäure hemmt, insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure.

- 20 10. Substanz, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein polyzyklisches Makrolacton ist und als Teilstrukturen mindestens ein Oxabicyclo-System und mindestens ein Michael-System als Doppelbindungs-25 system aufweist.

- 25 11. Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Derivat eines polyzyklischen Makrolactons gemäß einem der vorhergehenden An-30 sprüche ist.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Substanz gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

5

13. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Substanz, die die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure hemmt, und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

10

14. Verwendung einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind.

15 15. Verwendung einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind.

20 16. Verwendung einer Substanz zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure hemmt.

25

17. Verwendung einer Substanz zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien und/oder Protozoen zumindest mitbeeinflußt sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz die Synthese der para-Aminobenzoësäure aus Chorisminsäure hemmt.

30

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 eingesetzt wird.
- 5 19. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien zumindest teilweise Gram-positive Bakterien sind.
- 10 20. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien und/oder Protozoen gegenüber herkömmlichen Antibiotika resistent, insbesondere multiresistent, sind.
- 15 21. Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien und/oder Protozoen, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 verwendet wird.
- 20 22. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 produzieren kann.
- 25 23. Mikroorganismus nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Bakterienstamm der Bakteriengattung *Verrucosispora* oder eine Mutante davon ist.
- 30 24. Mikroorganismus, insbesondere nach Anspruch 22 oder Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er der Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) der Bakteriengattung *Verrucosispora* oder eine Mutante davon ist.

25. Verfahren zur Herstellung mindestens einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend die Verfahrensschritte:

- a) Kultivieren eines Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24,
- 5 b) Gewinnung eines Kulturüberstandes aus der Kultivierung,
- c) gegebenenfalls Herstellen eines Kulturfilters und
- d) gegebenenfalls Isolieren einer oder mehrerer Substanzen aus dem Kulturüberstand und/oder dem Kulturfiltrat.

10 26. Verfahren zur Herstellung mindestens einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend die Verfahrensschritte:

- a) Kultivieren eines Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24,
- b) Isolieren einer oder mehrerer Substanzen aus dem Mikro-  
15 organismus.

-----



Fig. 1

REST AVAILABLE COPY

CAAGTCGAGCGGAAGGCCCTCGGGTACTCGAGCGCGAACGGGTGAG  
TAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTGGATAACCCCTCGAAACGGG  
GGCTAATACCGAATATTCACTCACGGCGCATGTTGTGGGTGGAAAGTT  
TTTCGGCTTGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAAATG  
GCCTACCAAGGCACGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAT  
ATTGCACAATGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGAC  
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGG  
TACCTGCAGAAGAAGGCCGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAGA  
CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTATTGGCGTAAAGAAACTCGTAGG  
CGGCTTGTGCGCTGACTGTGAAAACCGTGGCTCAACTGCCGGCTGCA  
GTCGATACGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGAGACTGGAATTCTGGTG  
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGAACACCCTGGCGAAGGCCGG  
TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAG  
GATTAGATAACCTGGTAGTCACGCTGTAAACGTTGGCGCTAGGTGTGG  
GGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGAGCTAACGCTTAAGCGCCCCGCC  
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGCCCG  
CACAAACGGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACCGAAGAACCTTA  
CCTGGGTTGACATGCCGAAATCCTGCAGAGATGTGGGTCCTCGGG  
GCCGGTGACAGGTGGTCATGGCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTT  
GGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCTCGTCCATGTTGCCAGCAATT  
CGGTTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCAGGGCTCACGCATGCTA  
CAATGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCAA  
AAAGCCGGTCTCAGTCGGATGGGCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTC  
GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCG  
GGCCTTGTACACACCGCCCGTACGTCACGAAAGTCGGCAACACCGAAG  
CCGGTGGCCAACCTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGCTGGCGAT  
TGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGC

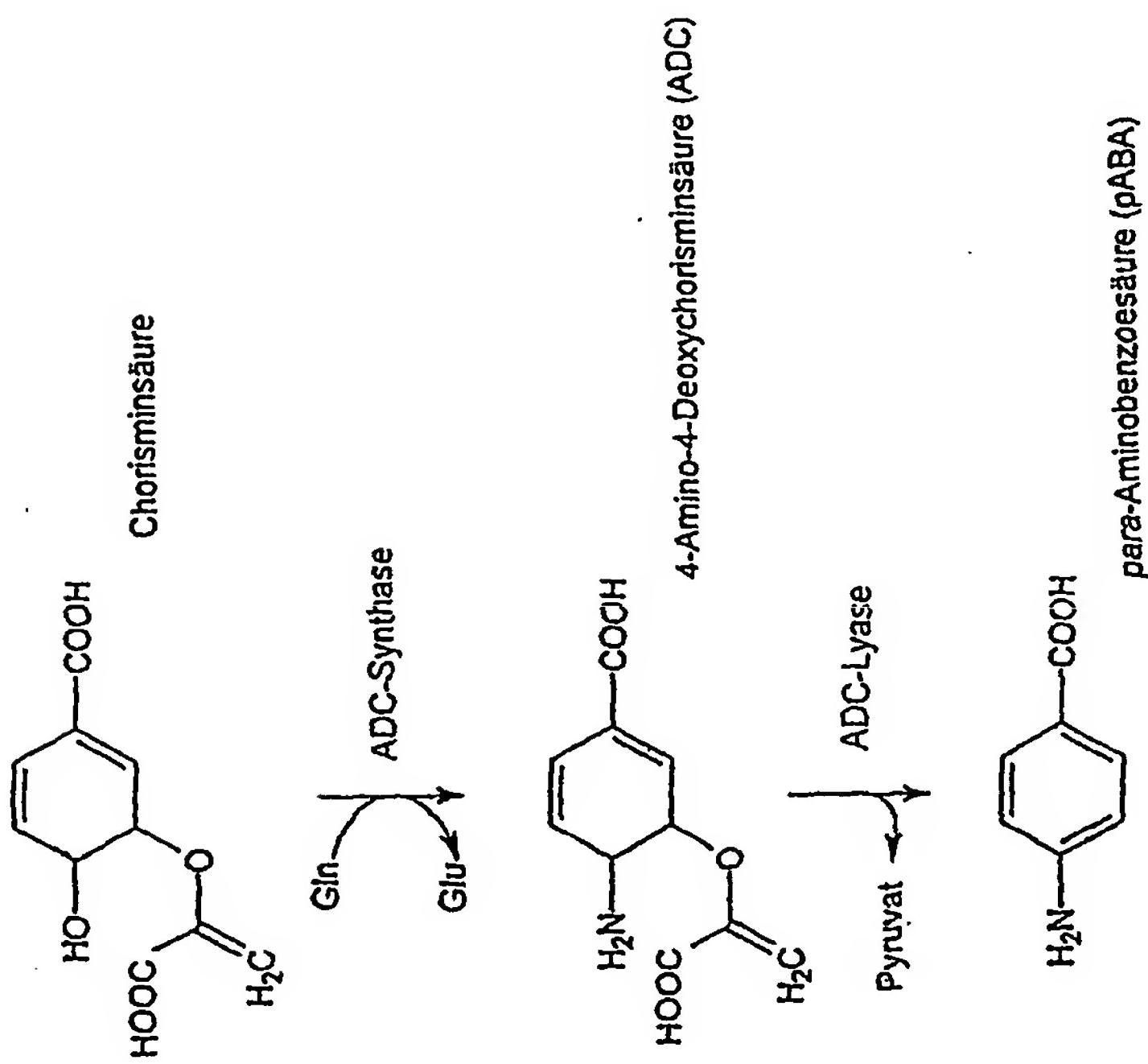
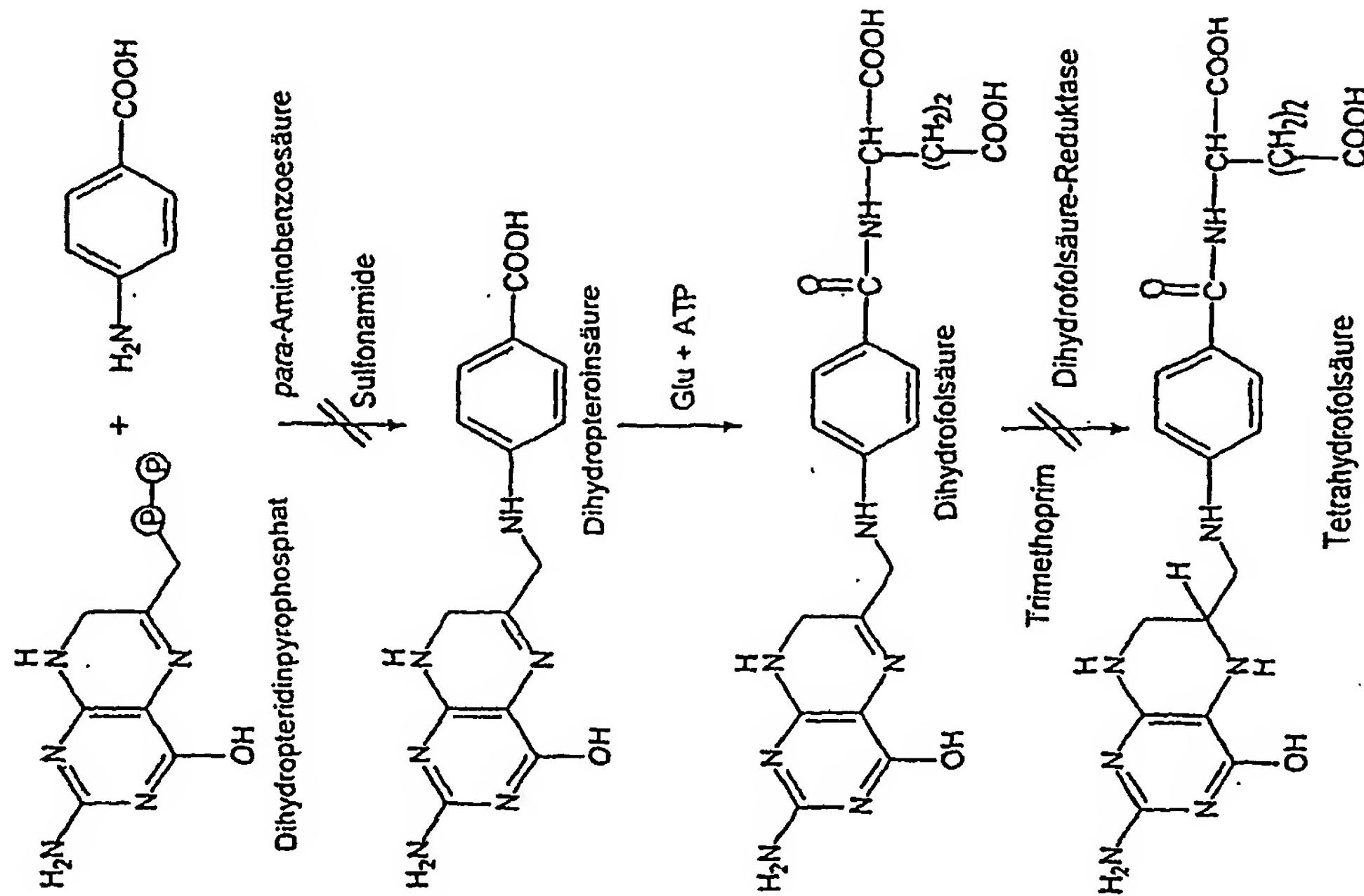
Fig. 2

0.02 substitutions/site.

```

graph TD
    Root --- Node1[Stamm AB-18-032]
    Node1 --- Vg[Verrucosispora gishornensis]
    Node1 --- Cj1[Catenuloplanes japonicus]
    Node1 --- Cc1[Catenuloplanes crispus]
    Node1 --- Ct1[Catellatospora citrea subsp. methionotrophica]
    Node1 --- Ct2[Catellatospora citrea subsp. citrea]
    Node1 --- Ct3[Catellatospora tsunoense]
    Node1 --- Ct4[Catellatospora koreensis]
    Node1 --- Mi1[Micromonospora inositola]
    Node1 --- Mi2[Micromonospora echinospora]
    Node1 --- Mi3[Micromonospora rosaria]
    Node1 --- Mi4[Micromonospora chersinia]
    Node1 --- Mi5[Micromonospora coerulea]
    Node1 --- As[Asanoa ferruginea]
    Node1 --- Sy[Spirilliplanes yamanashiensis]
    Node1 --- Ad1[Actinoplanes deccanensis]
    Node1 --- Ad2[Actinoplanes missouriensis]
    Node1 --- Ad3[Actinoplanes digitatis]
    Node1 --- Ad4[Actinoplanes consettensis]
    Node1 --- Vo[Virgisporangium ochraceum]
    Node1 --- Va[Virgisporangium aurantiacum]
    Node1 --- Da1[Dactylosporangium matsuzakiense]
    Node1 --- Da2[Dactylosporangium aurantiacum]
    Node1 --- Dt[Dactylosporangium thailandense]
    Node1 --- Dr[Dactylosporangium roseum]
    Node1 --- Pt[Pilimelia terevasta]
    Node1 --- Pa[Pilimelia anulata]
  
```

Fig. 3

Fig. 4

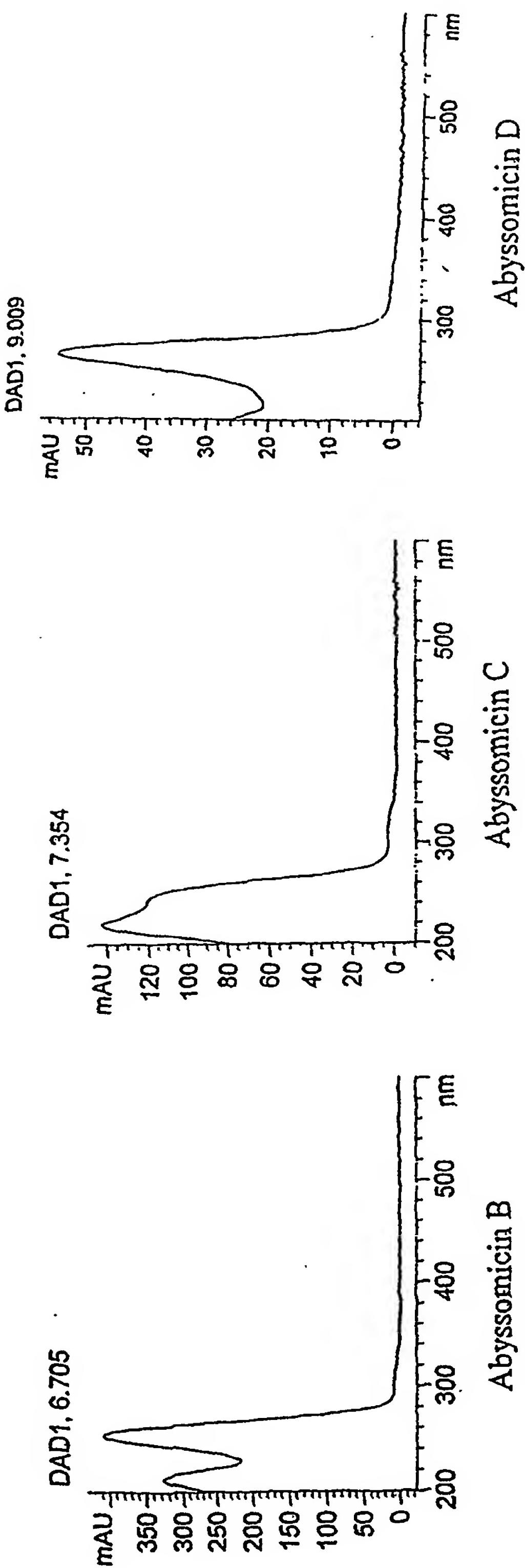


Fig. 5

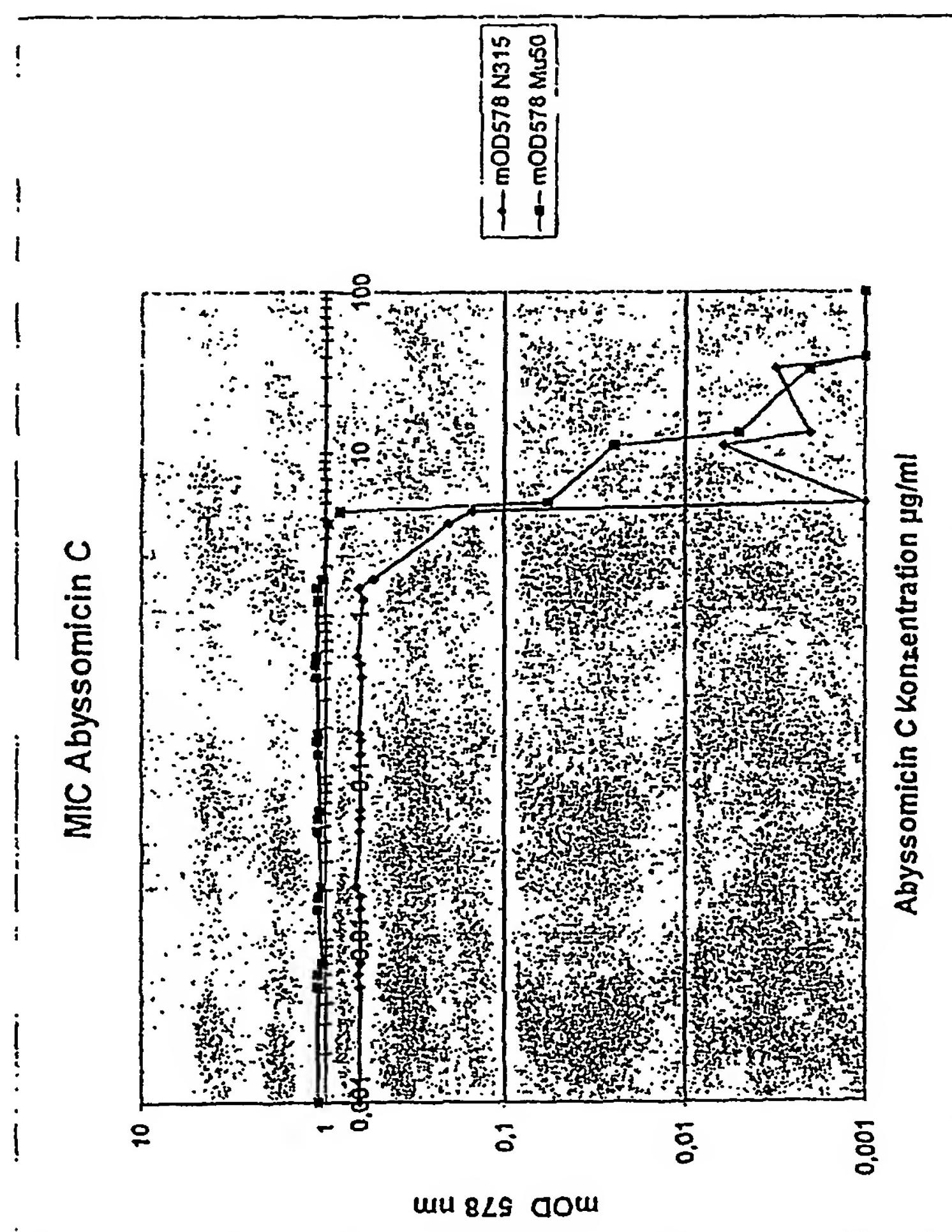
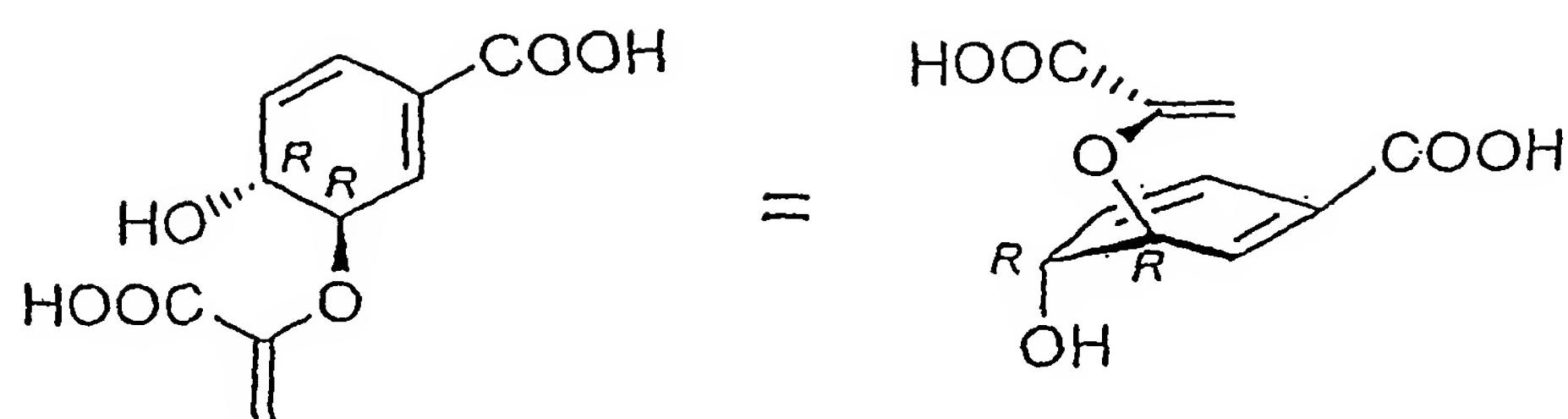


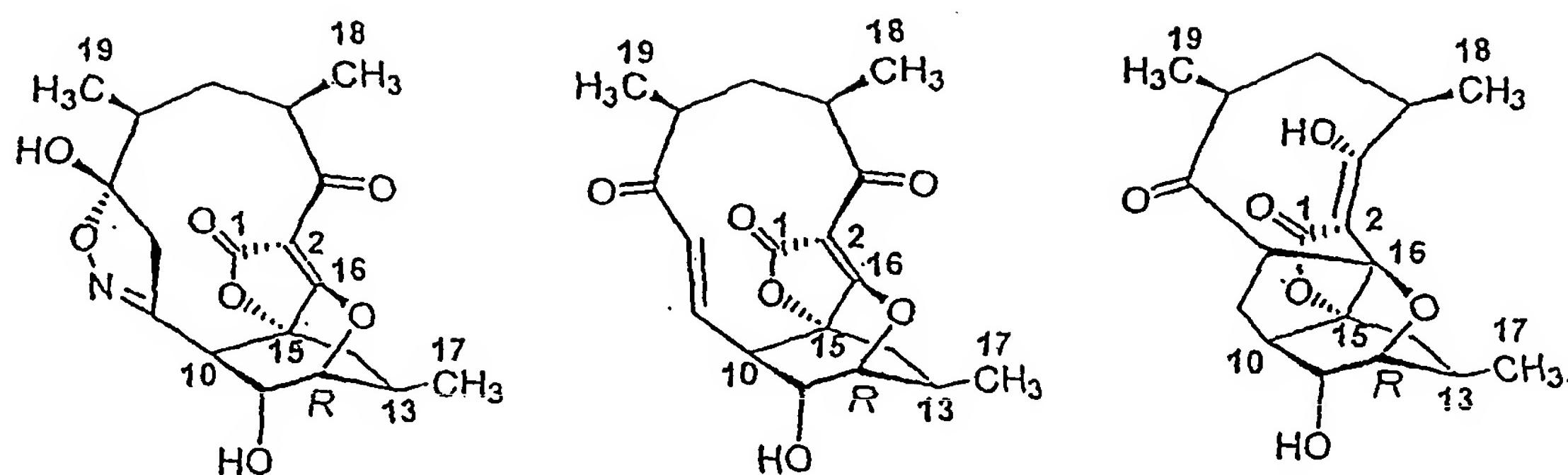
Fig. 6

BEST AVAILABLE COPY

(A)



(B)

Fig. 7

P 43 326 DE1.ST25.txt  
SEQUENCE LISTING

<110> Universität Tübingen

<120> Polyzyklische Makrolactone

<130> P 43 326 DE1

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1440

<212> DNA

<213> Verrucosispora spec., Stamm AB 18-032

<400> 1  
caagtcgagc ggaaaggccc ttcgggtac tcgagcggcg aacgggttag taacacgtga 60  
gcaacctgcc ctaggcttg ggataaccct cggaaacggg ggctaatacc gaatattcac 120  
tcacgggcgc atgtttgtgg gtggaaagtt tttcggcttg ggatgggctc gcggcctatc 180  
agcttgttgg tgggttaatg gcctaccaag ggcacgacgg gtagccggcc tgagagggcg 240  
accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctaç gggaggcagc agtgggaaat 300  
attgcacaat gggcggaagc ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg 360  
ttgttaaacct cttcagcag ggacgaagcg caagtacgg tacctgcaga agaagcgccg 420  
gccaactacg tgccagcagc cgccgttaaga cgttagggcgc gagcgttgc cggatttatt 480  
ggcgtaaag aactcgtagg cggcttgcg cgtcgactgt gaaaacccgt ggctcaactg 540  
cgggcctgca gtcgatacgg gcaggctaga gttcggtagg ggagactgga attcctggtg 600  
tagcggtgaa atgcgcagat atcaggagga acaccggtagg cgaaggcggg tctctggcc 660  
gatactgacg ctgaggagcg aaagcgtgg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc 720  
cacgctgtaa acgttggcgc ctaggtgtgg gggcctctc cggttctctg tgccgcagct 780  
aacgcattaa gcgc(cc)cc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga 840  
cgggggcccc cacaaacggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta 900  
cctgggtttg acatcgccgg aaatcctgca gagatgtgg gtccttcggg gccggtgaca 960  
ggtgtgcat ggctgtcgac agctcgatgc gtgagatgtt gggtaagtc ccgcaacgag 1020

## P 43 326 DE1.ST25.txt

cgcaaccctc gtcccatgtt gccagcaatt cggttgggg a ctcatgggag actgccgggg	1080
tcaactcgga ggaagggtggg gatgacgtca agtcatcatg ccccttatgt ccagggcttc	1140
acgcatacgta caatggccgg tacaatgggc tgcgataaccg tgaggtggag cgaatccaa	1200
aaagccggtc tcagttcgga tcgggtctg caactcgacc ccgtgaagtc ggagtcgcta	1260
gtaatcgca g atcagcaacg ctgcggtgaa tacgttccc ggccttgtac acaccgcccc	1320
tcacgtcacg aaagtccggca acacccgaag ccgggtggccc aacccttgc gagggagccg	1380
tcgaagggtgg ggctggcgat tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac cgaaagggtgc	1440

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/010661

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07D498/18 A61K31/42 A61P31/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 255 564 A (UMEZAWA ET AL) 10 March 1981 (1981-03-10) claim 1	1-4,9-21
A	-----	5-8, 22-26
X	EP 0 506 561 A1 (RHONE-POULENC RORER SA) 30 September 1992 (1992-09-30) claim 1	1-4,9-21
A	-----	5-8, 22-26
P,X	RIEGLINGER, J. ET AL.: "Abyssomicins, Inhibitors of the para-Aminobenzoic Acid Pathway Produced by the Marine Verrucosispora Strain AB-18-032" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 57, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 271-279, XP009043286 the whole document	1-26
	-----	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 2005

Date of mailing of the international search report

18/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Baston, E

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International Application No  
PCT/EP2004/010661**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BISTER, B. ET AL.: "Abyssomicin C-A Polycyclic Antibiotic from a Marine Verrucosispora Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway" ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, vol. 43, April 2004 (2004-04), pages 2574-2576, XP002315813 the whole document -----	1-26

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/010661

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 4255564	A	10-03-1981	JP	1412032 C		27-11-1987
			JP	53111088 A		28-09-1978
			JP	62016958 B		15-04-1987
			JP	1394394 C		11-08-1987
			JP	53111089 A		28-09-1978
			JP	61059319 B		16-12-1986
			JP	1430865 C		24-03-1988
			JP	53141289 A		08-12-1978
			JP	62036033 B		05-08-1987
			CA	1119588 A1		09-03-1982
			DE	2809598 A1		21-09-1978
			DE	2858223 C2		06-04-1989
			FR	2400022 A1		09-03-1979
			FR	2400032 A1		09-03-1979
			GB	1587685 A		08-04-1981
			US	4196280 A		01-04-1980
EP 0506561	A1	30-09-1992	FR	2674539 A1		02-10-1992
			AT	138934 T		15-06-1996
			AU	1552192 A		02-11-1992
			CA	2106675 A1		29-09-1992
			DE	69211340 D1		11-07-1996
			DE	69211340 T2		31-10-1996
			DK	577705 T3		01-07-1996
			EP	0577705 A1		12-01-1994
			ES	2087535 T3		16-07-1996
			WO	9217491 A1		15-10-1992
			GR	3020151 T3		30-09-1996
			HK	1008023 A1		30-04-1999
			IE	921000 A1		07-10-1992
			IL	101388 A		31-01-1996
			JP	3199734 B2		20-08-2001
			JP	6506350 T		21-07-1994
			MX	9201357 A1		01-10-1992
			NZ	242139 A		26-05-1993
			US	5591614 A		07-01-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/010661

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07D498/18 A61K31/42 A61P31/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 255 564 A (UMEZAWA ET AL) 10. März 1981 (1981-03-10)	1-4, 9-21
A	Anspruch 1	5-8, 22-26
X	EP 0 506 561 A1 (RHONE-POULENC RORER SA) 30. September 1992 (1992-09-30)	1-4, 9-21
A	Anspruch 1	5-8, 22-26
P, X	RIEDLINGER, J. ET AL.: "Abyssomicins, Inhibitors of the para-Aminobenzoic Acid Pathway Produced by the Marine Verrucosispora Strain AB-18-032" THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Bd. 57, Nr. 4, April 2004 (2004-04), Seiten 271-279, XP009043286 das ganze Dokument	1-26
	-----	
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
1. Februar 2005	18/02/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Baston, E

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2004/010661**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>BISTER, B. ET AL.: "Abyssomicin C-A Polycyclic Antibiotic from a Marine Verrucosispora Strain as an Inhibitor of the p-Aminobenzoic Acid/Tetrahydrofolate Biosynthesis Pathway" ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, Bd. 43, April 2004 (2004-04), Seiten 2574-2576, XP002315813 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-26

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/010661

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 4255564	A	10-03-1981	JP	1412032 C		27-11-1987
			JP	53111088 A		28-09-1978
			JP	62016958 B		15-04-1987
			JP	1394394 C		11-08-1987
			JP	53111089 A		28-09-1978
			JP	61059319 B		16-12-1986
			JP	1430865 C		24-03-1988
			JP	53141289 A		08-12-1978
			JP	62036033 B		05-08-1987
			CA	1119588 A1		09-03-1982
			DE	2809598 A1		21-09-1978
			DE	2858223 C2		06-04-1989
			FR	2400022 A1		09-03-1979
			FR	2400032 A1		09-03-1979
			GB	1587685 A		08-04-1981
			US	4196280 A		01-04-1980
EP 0506561	A1	30-09-1992	FR	2674539 A1		02-10-1992
			AT	138934 T		15-06-1996
			AU	1552192 A		02-11-1992
			CA	2106675 A1		29-09-1992
			DE	69211340 D1		11-07-1996
			DE	69211340 T2		31-10-1996
			DK	577705 T3		01-07-1996
			EP	0577705 A1		12-01-1994
			ES	2087535 T3		16-07-1996
			WO	9217491 A1		15-10-1992
			GR	3020151 T3		30-09-1996
			HK	1008023 A1		30-04-1999
			IE	921000 A1		07-10-1992
			IL	101388 A		31-01-1996
			JP	3199734 B2		20-08-2001
			JP	6506350 T		21-07-1994
			MX	9201357 A1		01-10-1992
			NZ	242139 A		26-05-1993
			US	5591614 A		07-01-1997